

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200426095

UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

桐花树双孔通道基因 (*AcTPC1*) 的克隆与
初步研究

Cloning and Preliminary Study of *Aegiceras corniculatum*
AcTPC1 Gene

陆孙杰

指导教师姓名: 杨盛昌 副教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 4 月 27 日

论文答辩时间: 2007 年 5 月 30 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 田惠桥 教授

评阅人:

2007 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

目 录

摘要（中文）	1
摘要（英文）	3
第一部分 前言	5
1.1 钙离子 (Ca^{2+})	5
1.2 双孔通道 (<i>TPC1</i>)	5
1.3 研究的目的是和意义	9
第二部分 材料和方法	11
2.1 实验材料	11
2.2 实验仪器设备和耗材	11
2.3 实验试剂和溶液	11
2.3.1 基因组提取和电泳	11
2.3.2 质粒提取	12
2.3.3 RNA 提取	13
2.3.4 甲醛变性凝胶 RNA 电泳	14
2.3.5 RNA 的反转录和 PCR 扩增	15
2.3.6 桐花树 <i>AcTPC1</i> 基因的原核表达	16
2.3.7 SDS-PAGE	16
2.3.8 酵母 CCH1 基因敲除和 <i>AcTPC1</i> 功能互补实验	17
2.4 实验方法	19
2.4.1 基因组 DNA 提取方法	19
2.4.2 基因组 DNA 的电泳	19
2.4.3 基因组 <i>TPC1</i> 基因片段的扩增	19
2.4.4 切胶回收 PCR 产物	20
2.4.5 T-A 克隆	21
2.4.6 大肠杆菌感受态的制备	21
2.4.7 重组质粒转化大肠杆菌感受态	21
2.4.8 大肠杆菌质粒 DNA 的提取（碱裂解法）	22
2.4.9 测序	22

2.4.10 桐花树 RNA 的提取.....	22
2.4.11 RNA 的电泳.....	23
2.4.12 cDNA 的合成.....	24
2.4.13 PCR 扩增 <i>TPC1</i> 基因片段.....	24
2.4.14 质粒的酶切鉴定.....	24
2.4.15 桐花树 <i>TPC1</i> 的 3' RACE.....	25
2.4.16 桐花树 <i>TPC1</i> 的 5' RACE.....	26
2.4.17 RT-PCR 扩增全长 <i>AcTPC1</i> 基因.....	29
2.4.18 桐花树 <i>AcTPC1</i> 基因的原核表达.....	29
2.4.19 SDS-PAGE 分析 <i>AcTPC1</i> 蛋白.....	30
2.4.20 酵母 CCH1 基因敲除.....	31
2.4.21 <i>AcTPC1</i> 功能互补实验.....	33
第三部分 结果、分析和讨论.....	35
3.1 基因组 DNA 提取结果.....	35
3.2 基因组 <i>TPC1</i> 基因片段的扩增.....	37
3.3 基因组 <i>TPC1</i> 基因片段的测序结果.....	39
3.4 桐花树 RNA 的提取结果.....	45
3.5 PCR 扩增 <i>TPC1</i> 基因片段.....	47
3.6 桐花树 <i>TPC1</i> 基因片段的生物学分析.....	49
3.7 3' RACE 扩增桐花树 <i>TPC1</i> 基因下游.....	52
3.8 5' RACE 扩增桐花树 <i>TPC1</i> 基因上游.....	55
3.9 RT-PCR 扩增桐花树全长 <i>AcTPC1</i> 基因.....	57
3.10 桐花树全长 <i>AcTPC1</i> 基因的生物信息学分析.....	58
3.11 SDS-PAGE 分析 <i>AcTPC1</i> 蛋白.....	61
3.12 酵母 CCH1 基因敲除和 <i>AcTPC1</i> 功能互补实验.....	63
第四部分 总结和展望.....	67
参考文献.....	69
致谢.....	72

Contents

Abstract(in Chinese).....	1
Abstract(in English).....	3
Section 1 Introduction	5
1.1 Calcium(Ca^{2+}).....	5
1.2 Two Pore Channel 1(<i>TPC1</i>).....	5
1.3 The intention and significance of this study.....	9
Section 2 Materials and Methods	11
2.1 Materials.....	11
2.2 Instruments and consumer goods.....	11
2.3 Reagents and solutions.....	11
2.3.1 Genomic DNA extraction and electrophoresis.....	11
2.3.2 Plasmid extraction.....	12
2.3.3 RNA isolation.....	13
2.3.4 RNA electrophoresis on formaldehyde denatured gel.....	14
2.3.5 RNA reverse-transcription and PCR amplification.....	15
2.3.6 <i>AcTPC1</i> expression in <i>E.coli</i>	16
2.3.7 SDS-PAGE.....	16
2.3.8 Yeast CCH1 disruption and <i>AcTPC1</i> functional complementation assay.....	17
2.4 Methods.....	19
2.4.1 Genomic DNA extraction.....	19
2.4.2 Genomic DNA electrophoresis.....	19
2.4.3 <i>TPC1</i> fragment amplification in genome.....	19
2.4.4 PCR products recovery from gel.....	20
2.4.5 T-A clone.....	21
2.4.6 <i>E.coli</i> competent cell preparation.....	21
2.4.7 Recombinant plasmid transformation to <i>E.coli</i> competent cell.....	21
2.4.8 <i>E.coli</i> plasmid DNA extraction.....	22
2.4.9 Sequencing.....	22

2.4.10 RNA isolation from <i>Aegiceras corniculatum</i>	22
2.4.11 RNA electrophoresis.....	23
2.4.12 cDNA synthesis.....	24
2.4.13 <i>TPC1</i> fragment amplification.....	24
2.4.14 Plasmid digestion with restriction endonuclease.....	24
2.4.15 3' RACE of <i>Aegiceras corniculatum TPC1</i> gene	25
2.4.16 5' RACE of <i>Aegiceras corniculatum TPC1</i> gene.....	26
2.4.17 Amplification full length <i>AcTPC1</i> gene with RT-PCR.....	29
2.4.18 <i>AcTPC1</i> expression in <i>E.coli</i>	29
2.4.19 SDS-PAGE analysis of <i>AcTPC1</i>	30
2.4.20 Yeast CCH1 disruption.....	31
2.4.21 <i>AcTPC1</i> functional complementation assay.....	33
Section 3 Results、 Analysis and Discussion	35
3.1 Result of genomic DNA extraction.....	35
3.2 <i>TPC1</i> fragment amplification in genome.....	37
3.3 Sequencing of <i>TPC1</i> fragment in genome.....	39
3.4 RNA isolation from <i>Aegiceras corniculatum</i>	45
3.5 <i>TPC1</i> fragment amplification.....	47
3.6 Bioinformatic analysis of <i>TPC1</i> fragment.....	49
3.7 3' RACE of <i>TPC1</i> downstream.....	52
3.8 5' RACE of <i>TPC1</i> upstream.....	55
3.9 Amplification full length <i>AcTPC1</i> gene with RT-PCR.....	57
3.10 Bioinformatic analysis of full length <i>AcTPC1</i> gene.....	58
3.11 SDS-PAGE analysis of <i>AcTPC1</i>	61
3.12 Yeast CCH1 disruption and <i>AcTPC1</i> functional complementation assay.....	63
Section 4 Conclusion and Perspective	67
References.....	69
Acknowledgments.....	72

摘 要

Ca^{2+} 通道在高等植物细胞中参与众多的信号转导过程并起着重要的作用。随着对 Ca^{2+} 通道研究的深入, 越来越多不同类型的 Ca^{2+} 通道陆续展示在人们的面前。2000 年 Ishibashi 等在家鼠 (rat) 中发现了一种新型的 Ca^{2+} 通道——*TPC1* (Two Pore Channel 1), 经研究证明它是一种电压调控的 Ca^{2+} 通道。自发现 *TPC1* 基因以来, 先后在拟南芥、水稻、烟草和小麦等植物中也克隆到了 *TPC1* 基因。本文采用桐花树等材料, 对这种新型的 Ca^{2+} 通道基因进行克隆和研究。

从桐花树等植物中提取基因组 DNA, 再根据已知的几种 *TPC1* 基因保守区域设计简并引物, 用 PCR 法成功地从桐花树等的基因组中扩增出基因组 *TPC1* 基因片段。

继而提取桐花树 RNA, 以其反转录生成的 cDNA 为模板进行 Touchdown PCR 扩增, 得到一条 643 bp 的特异性条带, 可编码 214 个氨基酸, 它与已知的 *TPC1* 基因同源性高。由这个片段推导的氨基酸序列包括 5 个跨膜片段 (TMS) 和 1 个孔道 (P) 的部分区域, 第 4 个跨膜片段富含带正电的氨基酸残基, 可能作为 *TPC1* 的电压探测器 (voltage sensor)。这种结构与电压门控 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 通道的第 4 个跨膜片段的结构和性质相似, 提示 *TPC1* 蛋白可能是被电压调控的。

根据扩增得到的桐花树 *TPC1* 基因片段设计引物进行 3' 和 5' RACE, 扩增桐花树 *TPC1* 基因未知的 3' 和 5' 端, 并成功得到约 1.9 kb (3' RACE) 和约 300 bp (5' RACE) 的特异性片段。测序和比对后证实, 我们成功扩增到桐花树 *TPC1* 基因的 3' 和 5' 端。

设计新引物, 用 PCR 法扩增出桐花树全长的 *TPC1* 基因。此基因编码区全长 2217 bp, 编码 738 个氨基酸, 全蛋白共含有两个同源结构域, 每个结构域含有六个跨膜区, 第五和第六个跨膜区之间有一个允许 Ca^{2+} 通过的孔道。在两个结构域之间, 每个结构域还存在一个 EF 臂。此基因与已知 *TPC1* 基因的同源性很高。这表明我们已成功克隆到桐花树 *TPC1* 基因, 我们把这个基因命名为 *AcTPC1*。

用 pET-22b 连接 *AcTPC1* 基因后, 转化到 BL21 中, 用 IPTG 诱导融合蛋白的表达, 并用 SDS-PAGE 分析 *AcTPC1* 蛋白, 在 85 KD 的位置出现了目的条带, 证明成功表达了 *AcTPC1* 蛋白。

运用PCR介导的酵母基因敲除法成功敲除酵母Ca²⁺通道——CCH1基因，并运用功能互补实验验证 *AcTPC1*互补CCH1缺陷菌株的功能，说明*AcTPC1*是一种Ca²⁺通道。

从以上结果可知，本实验成功克隆到桐花树 *AcTPC1* 基因，丰富了植物界 *TPC1* 基因家族成员，这为进一步研究 *AcTPC1* 的起源、进化、分子结构和开关机制，也为研究其在桐花树耐盐功能中的生理机制，以及了解它在信号转导、细胞代谢、生长发育等过程中的作用奠定了基础。

关键词：桐花树；双孔通道；*AcTPC1*

Abstract

Ca^{2+} channels participate in and play an important role in signal transduction in high plant cells. When the study goes deeply, more and more Ca^{2+} channel types present themselves. Ishibashi et al discovered a new type of Ca^{2+} channel—*TPC1* (Two Pore Channel 1) in rat in 2000. After that, *TPC1* genes were cloned in Arabidopsis, rice, tobacco and wheat too. In this article, we intend to clone and study the *TPC1* gene in *Aegiceras corniculatum* etc..

Genomic DNA was extracted from *Aegiceras corniculatum* etc., and degenerate primers were designed based on conserved domains of known *TPC1s*, and we successfully amplified *TPC1* gene fragment from the genomic DNA with PCR.

Then we isolated *Aegiceras corniculatum* RNA and reverse transcribed, the cDNA was used as PCR template, and a distinctive band of 643 bp was amplified by touchdown PCR. The fragment could encode 214 amino acids and shares high homology with known *TPC1s*. Translated to amino acids, the tentative peptide fragment contains 5 transmembrane segments (TMS) and 1 partial pore loop(P) segment. The 4th TMS segment harboring plenty of positively charged amino acids may serve as a voltage sensor. This structure is similar to S4 of voltage-dependent $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ channels, indicating that *TPC1* protein is probably voltage-dependent.

Based on the *TPC1* fragment, primers were designed to perform 3' and 5' RACE to get the unknown region. We achieved about 1.9 kb(in 3' RACE) and about 300 bp(in 5' RACE) DNA fragments. After sequencing and BLAST in GenBank, we confirmed that we got the unknown 3' and 5' regions.

We devised new primers and successfully amplified the full length *TPC1* gene in *Aegiceras corniculatum*. Its open reading frame(ORF) contains 2217 bp and encodes 738 amino acids, the protein has two conserved homologous domains, both of which contain 6 transmembrane segments and a pore loop between the S5 and S6 in each domain. In the center of *AcTPC1*, each domain has a EF binding arm. The gene's highly identities to known *TPC1s* demonstrate that we have successfully cloned the *TPC1* gene in *Aegiceras corniculatum*. We nominate it as *AcTPC1*.

We insert the *AcTPC1* into the plasmid pET-22b, and the recombinant plasmid was transformed to BL21, and IPTG was used to induce the infusion protein to express. In SDS-PAGE, the 85 KD *AcTPC1* appears at the right place, indicating the successful expression.

The Ca^{2+} channel gene—*CCH1* was directly disrupted with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. Functional complementation assay was performed and the *AcTPC1* can rescue mutant *cch1*, indicating the *AcTPC1* is a Ca^{2+} channel.

From the above results, we confirm the successfully cloning of the *AcTPC1* gene in *Aegiceras corniculatum*, a new member of *TPC1* family. This work founds the groundwork for further investigating *TPC1* on the origin, the evolution, the molecular structure and the mechanism of switch-on and switch-off; on the function mechanism in salt-tolerant; on the effects in signal transduction, cell metabolization, growth and development.

Key words: *Aegiceras corniculatum*; Two Pore Channel 1; *AcTPC1*

第一部分 前言

生物体会对一系列的环境刺激和自身发育信息作出响应。在长久的岁月中,生物体已经进化出各种各样的信号转导网络来产生适合刺激的响应,这种网络一般是由一系列的受体、非蛋白的信使物质、酶以及转录因子等多种元件组成。受体通常高度特异地接受生理刺激,然后再根据刺激的不同而把信号分配到不同的网络中,以作出不同的响应;酶和转录因子的特异性作用也与此相似。它们的编码基因在基因组上是很丰富的。非蛋白的信使物质相对于细胞中的受体、酶和转录因子来说,数量上就显得很少了,主要包括环核苷酸(cyclic nucleotides)、氢离子(H^+)、活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)、脂质(lipids)、钙离子(Ca^{2+})等,其中最重要的就是钙离子^[1]。介导 Ca^{2+} 运转的 Ca^{2+} 通道也备受关注。

1.1 钙离子 (Ca^{2+})

在植物必需的各种元素中, Ca^{2+} 具有极其特殊的作用。 Ca^{2+} 不仅仅是生物体的结构物质,更重要的是,它是一种参与众多信号转导过程、而且是目前已知的最通用、处于枢纽地位的细胞内第二信使物质,几乎参与调控所有的细胞和植物体对环境和自身变化的响应过程。在众多生物的和非生物的刺激所引起的信号转导过程中,细胞内的自由 Ca^{2+} 浓度都会发生明显的改变,从而引起不同的信号转导网络和通路产生不同的反应。也就是说 Ca^{2+} 作为传递信息的胞内信使,参与植物细胞对各种刺激的响应。这些刺激中,非生物的刺激包括不同波长的光、干旱、温度、机械刺激、触摸、渗透压胁迫、氧化剂胁迫等;生物的刺激包括植物激素(如脱落酸,赤霉素)、真菌激发子、结瘤因子等^[1,2]。每个引起 Ca^{2+} 浓度变化的刺激所产生的胞内 Ca^{2+} 浓度的变化都是特异的,胞质 Ca^{2+} 浓度变化的幅度大小,维持时间的长短及 Ca^{2+} 浓度变化曲线的不同形状,都可能被植物细胞用来作为区分不同刺激类型的 Ca^{2+} 信号,介导响应的产生,从而完成刺激一反应的偶联(Stimulus-Response Coupling)。总之, Ca^{2+} 参与的生物学反应非常广泛,可以说有信号转导的地方就有 Ca^{2+} 的身影。所以改变和测定细胞胞质内自由 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]_{cyt}$)水平,对于了解 Ca^{2+} 在植物细胞内信号转导中的作用极为重要。

1.2 双孔通道 (*TPC1*)

Ca^{2+} 通道主要是将 Ca^{2+} 从胞质外转运到胞质内或从胞内细胞器中释放到胞

质内,是胞内自由 Ca^{2+} 变化的一条重要途径。 Ca^{2+} 通道在高等植物细胞中参与众多的信号转导过程并起着重要的作用。随着对 Ca^{2+} 通道研究的深入,越来越多不同类型的 Ca^{2+} 通道陆续展示在人们的面前。特别是最近几年更是获得长足的进步,不仅在质膜中发现了电压依赖的 Ca^{2+} 通道 (Voltage-Dependent Calcium Channel, VDCC)、牵张激活的机械敏感性 Ca^{2+} 通道 (Stretch-Activated Calcium Channel) 等,而且在液泡膜中发现了众多具有不同开放调控机制的 Ca^{2+} 通道:受化学信使控制的 Ca^{2+} 释放通道、电压调控的 Ca^{2+} 通道、钙离子诱导的 Ca^{2+} 通道 (Ca^{2+} -induced Calcium Channel) 等^[3]。

2000 年 Ishibashi 等在家鼠 (rat) 中发现了一种新型的 Ca^{2+} 通道——*TPC1* (Two Pore Channel 1)^[4]。经研究证明它是一种电压调控的 Ca^{2+} 通道^[5-8],但它与以往发现的电压调控 Ca^{2+} 通道又有所不同。以往发现的电压调控 Ca^{2+} 通道是由 α -亚单位和其他几种辅助亚单位组成,其中 α -亚单位是最主要的结构和功能单位。此亚单位都有 4 个同源结构域 (Domain),每个结构域含有 6 个跨膜片段 (TMS, TransMembrane Segment) 和 1 个孔道 (P, Pore Loop)。*TPC1* 与电压调控 Ca^{2+} 通道的 α -亚单位具有很高的同源性,但它又有其独特之处:它只有这种 Ca^{2+} 通道 α -亚单位的一半,即只含有 2 个同源结构域,而每个结构域又与以往发现的电压调控 Ca^{2+} 通道 α -亚单位的结构域相似,也含有 6 个跨膜片段和 1 个孔道。所以它是一种新型的 Ca^{2+} 通道。

自 2000 年 Ishibashi 等发现家鼠中的双孔通道基因以来,对植物中双孔通道基因的研究正如火如荼地进行着,这种通道基因相继在不同的物种中被发现:2001 年 Furuichi 等发现了拟南芥中的 *AtTPC1* 基因^[5];2004 年 Kadota 等发现了烟草中的 *NiTPC1A* 和 *NiTPC1B* 基因^[7];同年 Kurusu 等发现了水稻中的 *OsTPC1* 基因^[6];2005 年 Wang 等发现了小麦中的 *TaTPC1* 基因^[8]。可以说,对双孔通道基因的克隆和对结构、功能等研究是今后生物学研究领域中又一研究热点。

(1) *TPC1* 的结构

离子通道是嵌合在膜上的跨膜蛋白,这就需要这种蛋白独特的特性:既要有疏水区以穿越脂质双分子层,又要有亲水区以游离于水环境接收和释放水溶液中的离子。可以利用蛋白的疏水性—亲水性分析来了解这种蛋白的结构。从 *AtTPC1* 的疏水性—亲水性分析图谱 (图 1.1) 中清楚地看到,它主要由两个结构域

(Domain 1 和 Domain 2) 构成, 每个结构域含有 6 个跨膜片段 (S1—S6) 和一个孔道 (P), 在两个结构域之间, 每个结构域包含一个 EF 臂, 臂上有蛋白激酶 C 磷酸化位点 (三角型)。

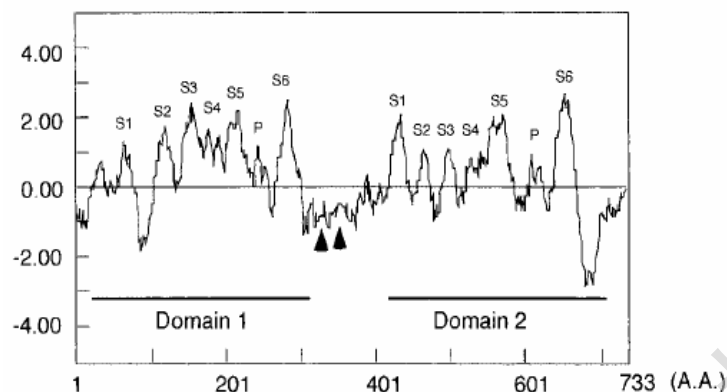


图 1.1 拟南芥 *AtTPC1* 蛋白疏水性—亲水性分析图谱。图片引自 Furuichi, 2001。

(2) *TPC1* 是一种 Ca^{2+} 通道

酵母 CCH1 基因编码的蛋白与动物 L-型 Ca^{2+} 通道的 α -亚单位具有显著的同源性, 研究证明 CCH1 蛋白是一种 Ca^{2+} 通道, 介导 Ca^{2+} 的内流, 并在酵母的交配中发挥作用。CCH1 缺陷的菌株 *cch 1* 对 Ca^{2+} 的吸收能力受到抑制, 在低 Ca^{2+} 培养基上的生长受到影响^[9]。在缺陷的 *cch 1* 突变株中表达拟南芥的 *AtTPC1* 基因, 可以使转化株拥有与野生型菌株相似的生长速率, 单位菌体对 Ca^{2+} 的吸收效率甚至比野生型菌株更高^[5]。转化 *OsTPC1*、*NiTPC1A* 和 *NiTPC1B*、*TaTPC1* 的 *cch 1* 突变株也能部分地恢复生长速率^[7, 8, 10]。这表明 *AtTPC1*、*OsTPC1*、*NiTPC1A* 和 *NiTPC1B*、*TaTPC1* 互补了酵母 Ca^{2+} 通道 CCH1 的功能, 也就是说 *TPC1* 本身就是一个 Ca^{2+} 通道。

(3) *TPC1* 是电压调控的 Ca^{2+} 通道

Furuichi 等在拟南芥中表达 Ca^{2+} 依赖的水母发光蛋白质, 并用蔗糖诱导这种蛋白质的发光来反映胞质 Ca^{2+} 浓度的增加。由于蔗糖可以激活蔗糖— H^{+} 共转运体, 而蔗糖— H^{+} 共转运体所介导的 H^{+} 内流可以导致细胞质膜的去极化, 去极化则可以激活电压调控的 Ca^{2+} 通道, 导致 Ca^{2+} 内流, 胞质 Ca^{2+} 浓度增加, 而胞质 Ca^{2+} 浓度的增加又可以激活 Ca^{2+} 依赖的水母发光蛋白质发光。当用蔗糖去浇灌表达水母发光蛋白质的拟南芥时, 荧光从植株的下端叶片移动到上端叶片。这表明植株在吸收蔗糖的同时, 引起电压依赖 Ca^{2+} 通道介导的 Ca^{2+} 内流而导致水母蛋白发光。用烟草花叶病毒 35S 启动子瞬时表达 *AtTPC1* cDNA 的叶片中, 蔗糖诱

导的水母发光蛋白发光强度比对照强 35%。另一方面, 表达反义 *AtTPC1* 的拟南芥叶片中, 蔗糖诱导的发光明显地受到抑制。表达反义 *AtSUC1* 和 *AtSUC2* 的拟南芥叶片中, 蔗糖诱导的发光也明显地受到抑制。这不仅可以证明 *AtTPC1* 是一种 Ca^{2+} 通道, 而且也可以证明 *AtTPC1* 是一种电压调控的内向整流 Ca^{2+} 通道 (voltage-activated inward-rectifying Ca^{2+} permeable channel) [5]。

Verapamil和nifedipine是L-型电压调控 Ca^{2+} 通道 (VDCC) 的特异性阻断剂。Hashimoto等发现, 用较高浓度verapamil可以阻断表达*OsTPC1*的酵母*cch1*突变株对 Ca^{2+} 的吸收, 饱和的nifedipine也可以阻断表达*OsTPC1*的*cch1*酵母对 Ca^{2+} 的吸收和积累。而T-型、P-型、Q-型、N-型电压调控 Ca^{2+} 通道的特异性阻断剂不能阻断表达*OsTPC1*的*cch1*酵母对 Ca^{2+} 的吸收和积累。这证明*TPC1*是L-型电压调控 Ca^{2+} 通道家族中的一员^[10]。

(4) *TPC1* 蛋白的亚细胞定位

未知蛋白在细胞内的定位也是一个令人非常关心的问题。绿色荧光蛋白 (GFP) 作为一个新型的报告基因, 在未知蛋白的定位中发挥了重要的作用。用 GFP 与感兴趣的蛋白连接在一起组成融合蛋白表达后, 由目的蛋白带领 GFP 到达其所属的位置, 从而在这个位置产生在荧光显微镜下可见的绿色荧光。Edgar Peiter等为了了解*AtTPC1*在植物细胞内的定位, 构建了*AtTPC1*-GFP融合蛋白的表达质粒, 并导入到拟南芥叶肉细胞原生质体中。在单独表达GFP的对照组细胞中, 荧光主要集中在细胞质和叶绿体中, 细胞破碎后, 由于GFP没有结合到特定的位置, 荧光随即分散开来, 这表明GFP仅仅存在于细胞质中; 表达*AtTPC1*-GFP融合蛋白的细胞中, 荧光明显地出现在细胞质膜和细胞内膜上, 从原生质体中分离出完整的液泡后, 荧光仍然存在于液泡膜上^[11]。用拟南芥叶芽中完整的液泡膜蛋白和微体中的蛋白做western杂交证实, 两者中都有*AtTPC1*蛋白存在, 从而进一步说明*TPC1*是定位在膜系统上的^[11]。

(5) *TPC1* 的生态学效应

Kurusu 等在悬浮培养的水稻细胞中过表达 *OsTPC1* 基因, 观察其引起的生态学效应。结果发现, 在环境 Ca^{2+} 含量为 3 mM (这是通常使用的培养基中的 Ca^{2+} 浓度) 时, 过表达 *OsTPC1* 基因的水稻细胞生长速度比对照的慢, 在环境 Ca^{2+} 含量为 30 mM 时, 过表达的细胞更是远远地比对照生长地慢, 但在环境 Ca^{2+}

含量为成为细胞生长的限制因素时 (0—0.5 mM), 过表达 *OsTPC1* 基因的细胞反而比对照的生长速度快很多。有趣的是 *OsTPC1* 敲除的突变株 *OsTPC1* 在环境 Ca^{2+} 含量高达 60 mM 时, 居然还能正常生长, 这说明没有 *OsTPC1* 基因的细胞对 Ca^{2+} 的敏感性比对照的低^[6]。

Kurusu 等也观察了过表达 *OsTPC1* 基因对水稻生长和发育的影响, 他们发现, 过表达 *OsTPC1* 基因的水稻在各个生长和发育阶段中, 生长速度都明显地降低, 影响最严重的植株在移栽后就死亡了。过表达 *OsTPC1* 基因的成熟植株其可育性也大打折扣。有趣的是, 把过表达 *OsTPC1* 基因水稻幼苗的根置于光照下, 根会变绿, 根的叶绿素含量远比对照高很多, 而在黑暗条件下则不变绿。这说明过表达 *OsTPC1* 基因使细胞加强了对光信号的转导, 增加了对光的敏感性^[6]。

(6) *TPC1* 参与隐地蛋白(cryptogein)诱导的 Ca^{2+} 信号转导

隐地蛋白是真菌隐地疫霉的一种激发子, 可以诱导胞内自由 Ca^{2+} 浓度的增加, 防御相关基因的表达, 诱导细胞程序性死亡等。在 *NtTPC1A* 和 *NtTPC1B* 共抑制的 BY-2 细胞中, 隐地蛋白诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 增加是短暂而微小的, 这与对照组相比是明显受到抑制的表现。这说明 *NtTPC1A* 和 *NtTPC1B* 参与了隐地蛋白诱导的 Ca^{2+} 内流。在 *NtTPC1A* 和 *NtTPC1B* 共抑制的 BY-2 细胞中, 隐地蛋白诱导的防御相关基因的表达延迟, 并受到抑制, 细胞程序性死亡也受到抑制; 而过表达 *AtTPC1* 基因的 BY-2 细胞对隐地蛋白诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上升、细胞程序性死亡的敏感性都有所增强。这说明 *TPC1* 参与了隐地蛋白引起的 Ca^{2+} 移动, 并在隐地蛋白诱导的信号转导通路中发挥了至关重要的作用^[7]。

1.3 研究的目的和意义

双孔 Ca^{2+} 通道 *TPC1* 基因是植物界中第一次克隆到的电压调控 Ca^{2+} 通道基因。

TPC1 是 2000 年由日本科学家 Ishibashi 率先发现的^[4], 其后又有 Furuichi^[5]、Kadota^[7]、Kurusu^[6]、Wang^[8]等学者对拟南芥、烟草、水稻和小麦等不同物种的双孔通道进行了克隆和研究, 丰富和发展了对双孔离子通道的认识。但到目前为止, 有关植物 *TPC1* 基因的研究仅局限在这几种物种中。

桐花树是一种生长在海岸潮间带或海潮能达到的河流入海口的木本植物。为适应其独特的生境条件, 它们必须能耐受较高浓度的盐分, 这是与陆生木本植物

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库